

Rec'd PCT/PTO 02 MAR 2005

PCT/03/01845

RO/KR 08.09.2003

REC'D 29 SEP 2003

WIPO PCT



별첨 사본은 아래 출원의 원본과 동일함을 증명함.

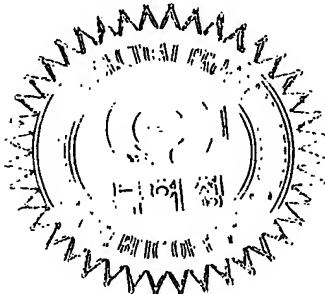
This is to certify that the following application annexed hereto is a true copy from the records of the Korean Intellectual Property Office.

출원 번호 : 10-2002-0055635
Application Number

출원 년 월 일 : 2002년 09월 13일
Date of Application

출원인 : 주식회사 엘지화학
Applicant(s) LG CHEM. LTD.

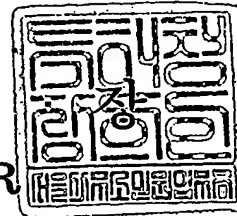
PRIORITY DOCUMENT
SUBMITTED OR TRANSMITTED IN
COMPLIANCE WITH
RULE 17.1(a) OR (b)



2003 년 08 월 22 일

특 허 청

COMMISSIONER



【서지사항】

【서류명】	특허출원서
【권리구분】	특허
【수신처】	특허청장
【참조번호】	0001
【제출일자】	2002.09.13
【국제특허분류】	C12P
【발명의 명칭】	졸-겔 캡슐화 공정을 이용한 단백질 칩 표면으로의 표적 단백질의 고정화 방법 및 그 용도
【발명의 영문명칭】	IMMOBILIZATION METHOD OF TARGET PROTEIN ON PROTEIN CHIP SURFACE USING SOL-GEL ENCAPSULATION AND APPLICATIONS THEREOF
【출원인】	
【명칭】	주식회사 엘지화학
【출원인코드】	1-2001-013456-3
【대리인】	
【성명】	김성기
【대리인코드】	9-1998-000093-9
【포괄위임등록번호】	2001-022342-8
【대리인】	
【성명】	강승옥
【대리인코드】	9-1999-000321-4
【포괄위임등록번호】	2002-023658-3
【발명자】	
【성명의 국문표기】	김소연
【성명의 영문표기】	KIM, Soyeon
【주민등록번호】	711005-2173118
【우편번호】	305-390
【주소】	대전광역시 유성구 전민동 청구아파트 101동 1406 호
【국적】	KR
【발명자】	
【성명의 국문표기】	김영득
【성명의 영문표기】	KIM, Young-Duk
【주민등록번호】	681008-1055318

【우편번호】 305-390
【주소】 대전광역시 유성구 전민동 청구아파트 101동 904호
【국적】 KR
【발명자】
【성명의 국문표기】 김필석
【성명의 영문표기】 KIM, Philseok
【주민등록번호】 730530-1654319
【우편번호】 110-062
【주소】 서울특별시 종로구 신문로2가 1-325번지
【국적】 KR
【취지】 특허법 제42조의 규정에 의하여 위와 같이 출원합니다. 대리인
김성기 (인) 대리인
강승옥 (인)
【수수료】
【기본출원료】 20 면 29,000 원
【가산출원료】 2 면 2,000 원
【우선권주장료】 0 건 0 원
【심사청구료】 0 항 0 원
【합계】 31,000 원
【첨부서류】 1. 요약서·명세서(도면)_1통

【요약서】**【요약】**

본 발명은 표적 단백질을 단백질 칩의 표면에 고밀도로 집적 배열하는 데 사용되는 고정화 반응 방법 및 이를 이용해 제작된 단백질 칩에 관한 것이다. 보다 상세하게는 진단, 고효율 스크리닝(HTS), 효소활성측정 등의 다양한 목적에 사용되는 각종 단백질들을 폴리글리세릴실리케이트(PGS)로 캡슐화하여 폴리비닐 아세테이트(PVAc)로 코팅한 유리 표면 위에 잉크젯분사를 통해 고밀도로 미세 집적 배열하는 졸-겔 캡슐화 과정을 이용한 단백질 칩의 제조 방법에 관한 것이다.

【대표도】

도 1

【색인어】

단백질 칩(protein chip), 단백질 고정화(protein immobilization), 졸-겔 캡슐화(sol-gel encapsulation), 항원-항체 진단(antigen-antibody diagnosis), 고효율 스크리닝(High Throughput Screening; HTS)

【명세서】

【발명의 명칭】

줄-겔 캡슐화 공정을 이용한 단백질 칩 표면으로의 표적 단백질의 고정화 방법 및 그 용도{IMMOBILIZATION METHOD OF TARGET PROTEIN ON PROTEIN CHIP SURFACE USING SOL-GEL ENCAPSULATION AND APPLICATIONS THEREOF}

【도면의 간단한 설명】

도 1은 본 발명의 핵심 기술인 줄-겔 공정에 의한 단백질 칩 제작의 전체적인 모식도이고,

도 2는 3 단계로 진단을 실시하는 응용 예를 보여주는 모식도이며,

도 3은 본 발명의 기술을 이용하여 제작한 단백질 칩을 이용하여 HIV 진단을 위한 항원-항체 반응을 실시한 예를 나타낸 것이고,

도 4는 본 발명의 기술을 이용하여 제작한 단백질 칩의 상태를 광학 현미경으로 관찰한 상을 도시한 것이며,

도 5는 본 발명의 단백질 칩 상의 하나의 스폿을 공초점 레이저 주사 현미경을 통하여 표면에 직각방향으로 분할하여 분석한 상을 도시한 것이다. 흰색은 광학 이미지를, 붉은색은 형광 이미지를 나타내고 있다. 광학 이미지는 겔화된 바탕물질의 이미지이며, 형광 이미지는 이들 내에 분포하고 있는 단백질을 보여주고 있다.

【발명의 상세한 설명】**【발명의 목적】****【발명이 속하는 기술분야 및 그 분야의 종래기술】**

- <6> 본 발명은 질병의 진단 및 고효율 스크리닝(High Throughput Screening; HTS) 등의 방법에 사용 가능한 단백질 칩(protein chip)의 제작에 이용할 수 있는, 단백질 칩의 표면에 표적 단백질을 고밀도로 집적 배열하는 데 이용되는 고정화 방법 및 이를 이용하여 제작된 단백질 칩에 관한 것이다.
- <7> 단백질 칩은 바이오칩(biochip)의 한 종류로서, 다양한 종류의 표적 단백질을 단위 면적의 고체상 지지체의 표면에 고집적 미세배열(intense microarray)한 것으로, 이러한 단백질 칩을 이용하면 소량의 시료로 면역진단, 고효율 스크리닝(HTS), 효소활성측정 등의 단백질을 이용한 여러 목적의 실험을 대규모로 손쉽게 실시할 수 있다.
- <8> 이미 개발되어 상용화된 DNA 칩의 제작과 같은 원리와 기술요소를 도입하여 단백질 칩을 제작하려는 노력이 행해지고 있다. 일반적으로, 상용화된 DNA 칩의 대부분은 코팅물질로 표면을 전 처리한 유리판 위에 DNA를 고정화 시키는 반응으로 제작한 것들이다. DNA 칩의 제작에 사용되는 방법과 마찬가지로, 단백질 칩에 있어서도 코팅물질로 표면을 전 처리한 유리판 위에 단백질을 고정화 시키고자 하는 시도가 이루어지고 있다. 그러나, 고정되어지는 표적 단백질의 물리화학적 특성 차이로 인해 다양한 문제점들이 발생되고 있다.

<9> 초기의 단백질 칩은 표면 처리된 유리판 위에 단백질을 그대로 부착시켜서 간단한 결합 분석(binding assay)을 수행하는 것이었으나 고정화된 단백질의 활성 여부에 따라 실제 작동여부가 좌우되어 본래의 목적을 달성하는 데 어려움이 많았다(MacBeath 및 Schreiber의 문헌[*Science* 289:1760, 2000] 참조). 이러한 문제점은 전술한 바와 같이 단백질이 갖는 고유의 물리화학적 특성 차이로 인하여 발생하는 단백질의 변성(denaturation) 혹은 불활성화, 분해(degradation) 등으로부터 야기되는 것이다. 이러한 문제점을 극복하고자, DNA와는 구별되는 단백질의 특성에 부합하는 단백질 부착 표면 처리 기술 및 단백질 고정 물질 등에 대한 연구가 이루어지고 있다.

<10> 그러한 연구는 단백질 칩 표면 상에 고정반응을 일으키면서 동시에 단백질의 활성을 유지하려는 방법을 제공하는 데 초점이 맞추어진 것으로서, 예컨대 퍼킨 엘머(PerkinElmer)에 최근 인수된 패커드 바이오사이언스(Packard Bioscience)의 히드로겔(Hydrogel)TM 코팅 슬라이드, 프로링스(Prolinx)의 버사링스(Versalinx) 칩, 지오믹스(Zyomyx)의 바이오 칩인 PDC 칩 등을 들 수 있다. 특히, 히드로겔 코팅 슬라이드는 3차원 폴리아크릴아미드 겔을 이용한 기술로서, 광학적으로 평평한 실란처리된 스위스(Swiss) 유리를 기본 지지 물질로 사용하고, 그 위에 표면을 변형시킨 아크릴아미드 중합체를 올려놓아서 단백질의 결합력 및 구조적 안정성을 향상시킨 것이다.

<11> 또한, 프로링스의 버사링스 칩은 TiO_3 표면 위에 비오틴 유도체화된 폴리(L-리신)-g-폴리(에틸렌 글리콜)의 자기조립단층(self assembly monolayer)을 형성하여 단백질 화합성 표면을 만들어서 단백질의 활성을 증가시킨 것이다. 이 방

법들은 3차원인 미세구조를 만들어서 변형된 표면에 단백질을 집적하여 스폿 내의 단백질들의 활성을 유지하는 데 도움을 주려는 것이다. 이러한 방법 외에도 미세가공을 이용한 마이크로웰 형태의 칩들을 만들어서 용액 상태의 칩을 제작하기도 한다.

<12> 졸-겔 과정 또한 이러한 미세가공을 통해 미세구조를 만드는 데 이용되어 온 기술로서, 특히 무기 물질에 생체분자들을 화학적으로 부착시키는 대신 온화한 공정을 통해 공유 결합 망을 형성하여 생체분자들을 고정화하는 데 많이 이용되어 온 기술이다(Gill I. 및 Ballesteros A.의 문헌[*Trends Biotechnol.* 18:282, 2000] 참조). 이 같은 효소를 비롯한 많은 생체분자들이 괴상 졸-겔 매트릭스 안에 고정되어 생체촉매나 바이오센서의 제작에도 이용되고 있으며(Reetz 등의 문헌[*Adv. Mater.* 9:943, 1997] 참조), 특히, 투명한 광학적 성질 때문에 광학적 발색 검출에도 이용되고 있다(Edminston 등의 문헌[*J. Coll. Interf. Sci.* 163:395, 1994] 참조). 또한, 생체분자는 졸-겔에 고정화되면 화학적으로 안정화될 뿐만 아니라 열적으로도 매우 안정화된다고 알려져 있다(Dave 등의 문헌[*Anal. Chem.* 66:1120, 1994] 참조). 졸-겔 과정은 그냥 단순한 고정뿐 아니라 고체 지지체 위에 미세구조를 형성하여 패터닝(patterning) 하는 방법에도 이용되고 있다. 예컨대, 모세관내 마이크로-모듈링(Micro-moduling in-capillaries; MIMIC) 기법(Kim 등의 문헌[*J. Ferment. Bioeng.* 82:239, 1995]; Marzolin 등의 문헌[*Adv. Mater.* 10:571, 1998]; Schuller 등의 문헌[*Appl. Optics* 38:5799, 1999] 참조)으로 지칭되는 기술은 중시(mesosopic) 실리카를 패터닝 하는 기술이다. 이 기술은 미시유체공학의 기본적인 패터닝에 이용될 수 있다.

<13> 하지만, 단백질의 경우 pH 등의 여러 인자에 의해 영향을 받기 때문에 졸-겔 과정에서는 졸 상태에서부터 단백질을 첨가하여 활성을 유지하는 조건을 설정하는 것이 중요하다. 이를 위해 중성 pH 등 여러 가지 온화한 조건을 이용하여 단백질과 졸을 함께 미리 섞어주어 단백질을 패턴화하는 등의 기술(Kim 등의 문헌[Biotechnol. Bioeng. 73:331~337, 2001] 참조)이 발표되고 있지만, 중성 pH에서는 졸-겔 과정이 급격히 진행되어 겔로 될 뿐만 아니라 첨가제의 선택에 따라서 균열이 생기거나 불투명하게 되는 등의 문제점이 있다. 단백질 칩의 경우, 집적을 위해서는 졸이 겔로 되는 시간을 늦추도록 조절하는 것도 졸-겔 과정의 승패를 결정하는 중요한 요소 중 하나라고 할 수 있다. 또한, 조성의 적절한 배합을 통해 졸-겔 과정 동안에 적당한 점도를 유지하고, 겔이 된 후에 광학적으로 유용한 물질로 만드는 것도 단백질 칩을 만드는 데 있어서 또 하나의 중요한 요소라고 할 수 있다.

【발명이 이루고자 하는 기술적 과제】

<14> 본 발명의 목적은 단백질 칩의 제작 시 표적 단백질을 칩의 표면에 고밀도로 집적 배열하는 데 사용되는 단백질의 고정화 반응 방법을 제공하는 것이다.

<15> 본 발명의 또 다른 목적은 상기 방법으로 제작된 진단용 단백질 칩을 제공하는 것이다.

【발명의 구성 및 작용】

- <16> 본 발명에서는 단백질 칩의 제작 시, 칩의 표면에 표적 단백질의 고밀도 집적 배열을 가능하게 하는 졸-겔 캡슐화 방법을 통한 새로운 단백질의 고정화 반응 방법이 제공된다.
- <17> 본 발명자들은 상기 언급한 바와 같이 단백질이 갖는 고유의 물리화학적 특성의 차이로 인하여 단백질 칩 제작 시 발생하는 단백질의 변성 혹은 불활성화, 분해 등의 문제를 해결하고자, 공지된 졸-겔 캡슐화 공정(sol-gel encapsulation process)을 단백질 칩 제작에 채택하여 표적 단백질을 칩의 표면에 고정시키고자 하였다. 또한, 단백질이 고정되는 칩의 표면을 고분자 물질로 코팅함으로써 칩의 표면이 졸-겔 캡슐화 공정을 이용한 고밀도 집적에 대해 최적화되도록 하였다.
- <18> 칩의 표면에 단백질을 고밀도로 집적 고정화하는 데 있어서, 졸-겔 캡슐화에 사용되는 기본 물질은 일반적으로 사용되는 실리케이트 단량체와는 구별되는 것으로, 실리케이트 단량체와 글리세롤의 반응으로 얻어지는 중합 중간체인 폴리글리세릴실리케이트(PGS)이다. 상기 중합 중간체는 단백질 칩 표면에서 집적된 단백질과 반응물질의 반응이 용이하게 일어날 수 있도록 고정된 겔이 최적화된 공극 크기를 갖도록 하는 데 있어서 중요한 기능을 하는 물질이다(Gill 및 Ballesteros의 문헌[J. Am. Chem. Soc. 120:8587, 1998] 참조).
- <19> 상기 중합 중간체인 폴리글리세릴실리케이트(PGS)로서는, 단량체로서 테트라메틸오르토실리케이트(TMOS), 테트라에틸오르토실리케이트(TEOS), 메틸트리메톡시실란(MTrMOS), 에틸트리에톡시실란(ETrEOS), 테트라메톡시실리케이트(TMS),

메틸트리메톡시실리케이트(MTMS), 3-아미노프로필트리메톡시실리케이트 중에서 선택되는 1종 이상의 실리케이트 유도체와 글리세롤을 반응시켜 얻어지는 것을 사용할 수 있다. 폴리글리세릴실리케이트(PGS)는 당분야에 공지된 방법에 따라 제조할 수 있다.

<20> 칩의 표면에 집적되어지는 졸 혼합물은 상기 과정으로부터 얻어진 폴리글리세릴실리케이트(PGS), 칩의 표면 상에 집적하고자 하는 단백질들 및 pH 완충용액을 포함한다. 상기 pH 완충용액으로는 인산염 완충액을 사용하는 것이 바람직하며, pH는 5 ~ 9의 범위에서 선택할 수 있고, 그 중에서도 pH 5, 5.5, 6, 6.5, 7, 7.5, 8, 8.5가 바람직하다.

<21> 상기 폴리글리세릴실리케이트(PGS)와 단백질을 포함하는 졸 혼합물이 칩 표면에 고밀도로 집적되도록, 분자량 범위가 800 ~ 200000인 폴리비닐아세테이트(PVAc)를 염화메틸렌(MC), 테트라히드로푸란(THF) 중에서 선택되는 용매에 용해시켜서 칩의 표면을 스핀 코팅하였다. 폴리비닐아세테이트 (PVAc)의 분자량은 800, 1200, 3000, 5000, 12000, 22000, 50000, 100000 중에서 선택되는 것이 바람직하다. 상기 용매의 농도는 5 ~ 20% 범위로 사용되며, 그 중에서도 5%, 10%, 15%, 20%인 것이 바람직하다.

<22> 상기 본 발명을 통해 칩 표면에 고밀도로 집적 가능한 단백질은 HIV p24, Combo, RgpIII, IgG-Cy3를 포함하여 감염성 질병 진단(infectious disease diagnosis)을 위해 사용되어지는 항원 혹은 항체, 또는 암 진단(cancer diagnosis)을 위해 사용되어지는 항원 혹은 항체, 활성측정에 이용되어지는 효소들 중에서 선택될 수 있다.

- <23> 폴리글리세릴실리케이트(PGS)와 단백질을 포함하는 졸 혼합물을 상기의 방법으로 코팅된 칩의 표면에 고밀도 미세집적기를 이용하여 집적하여 스팟의 직경이 100 μm 정도인 단백질 칩을 제작한다, 본 발명에서는 10 ~ 10,000 스팟/ cm^2 의 칩을 제작하였다.
- <24> 본 발명을 실시예에 의거하여 상세히 설명하면 다음과 같다. 단, 하기 실시예는 본 발명을 예시하는 것일 뿐, 본 발명이 이들만으로 한정되는 것은 아니다.
- <25> 실시예 1: 졸-겔 캡슐화를 위한 중합 중간체의 제조
- <26> 테트라메틸오르토실리케이트(TMOS) 0.048 몰과 메탄올(10%)을 혼합한 후, HCl (0.25 M)을 30분에 걸쳐 가하였다. 이 혼합 용액을 70℃에서 6시간 동안 반응시켰다.
- <27> 반응 혼합 용액의 온도를 50℃까지 낮춘 뒤 글리세롤(0.192 몰)을 30분에 걸쳐 가하였다. 이 혼합 용액을 50℃에서 16시간 동안 반응시켰다. 합성된 물질을 실온에서 회전 증발시켜 메탄올을 제거하였다. 제조된 폴리글리세릴실리케이트(PGS)를 20%(g/ml)의 수용액으로 만들어 사용하였다.
- <28> 실시예 2: 졸-겔 공정을 이용한 어레이형 단백질 칩의 제작
- <29> 실시예 1에서와 같이 합성된 폴리글리세릴실리케이트(PGS) 수용액을 이용하여 단백질 활성을 최대화하여 고정화하기 위해서 하기의 방법으로 단백질 칩을 제작하였다.
- <30> 단계 1: 어레이 플레이트의 코팅

- <31> 슬라이드 유리판(76 mm x 26 mm, 코닝)에 3% PVAc(폴리비닐 아세테이트)/THF(테트라히드로푸란)로 스핀 코팅을 실시하였다. 스핀 코팅은 라우렐(Laurell) 스핀 코터로 500 rpm에서 10초간 전처리 후, 1,000 rpm에서 40초간 실시하였다.
- <32> 단계 2: 졸 형태의 폴리글리세릴실리케이트(PGS)-단백질 혼합물의 제조
- <33> 칩 표면에 집적하기 위한 졸 형태의 폴리글리세릴실리케이트(PGS)-단백질 혼합물을 제조하기 위해 폴리글리세릴실리케이트(PGS) 수용액, 테트라메틸오르토실리케이트(TMOS), 메틸트리메톡시실란(MTMOS)을 동비로 혼합하였다. HCl(5 mM)을 첨가하여 혼합한 후 인산나트륨(100 mM, pH 7), 단백질 및 PBS 용액(15%)을 넣고 섞어주었다. 사용된 단백질들은 실시예 3과 4에 자세히 설명되어 있다.
- <34> 단계 3: 칩 상으로의 집적
- <35> 상기 단계 1에서 준비한 3% PVAc/THF로 코팅된 유리 슬라이드 상에 단계 2에서 준비된 졸 상태의 PGS-단백질 혼합물을 어레이어(카르테시안; Cartesian)의 잉크젯 집적 프로그램을 이용하여 직경 100 ~ 500 μ m 가량의 원형 스팟이 되도록 칩의 표면에 집적하여 단백질 칩을 완성하였다.
- <36> 실시예 3: 단백질 칩 상의 단백질 집적 여부 확인
- <37> 실시예 2에서 제작된 단백질 칩에 대하여 칩 표면에 고정된 단백질들이 실제로 다양한 목적의 반응에 사용가능한지를 확인하기 위하여 (1) 단백질의 고정 상태를 확인하였고, (2) 반응 여부를 확인하는 발색 반응이 스캐너를 통해 측정가능한지 여부를 확인하였다.

<38> 단계 1: 고정된 단백질의 투명도 및 균열 확인

<39> 단백질 칩 표면에 집적된 단백질 스팟의 투명도와 균열을 관찰하기 위해 집적된 스팟을 광학 현미경으로 관찰하였고, 그 결과는 도 4와 같이 나타났다. N번 스팟은 단백질이 없는 상태이며, 여러 가지 다른 단백질을 첨가한 경우(1번 ~ 6번, P번 스팟)에도 광학 현미경으로 관찰 시 투명하게 보였고 굳어진 후에도 금이나 부서짐이 없이 깨끗하고 맑은 스팟을 나타내었다.

<40> 단계 2: 집적된 단백질의 고정 여부 및 발색 여부 확인

<41> 집적된 단백질이 칩의 표면에서 이루어지는 다양한 반응 조건에서도 그대로 남아 있을 수 있는지, 또한 정확히 고정된 단백질의 발색 반응 시 스캐너를 통해서 발색 여부를 확인할 수 있는지를 알아보기 위하여 Cy3로 표지된 Cy3-접합 항-토끼 IgG(시그마-알드리치 컴퍼니)를 실시예 2와 같은 방법으로 칩의 표면 위에 집적 시켰다. 이렇게 집적된 항-토끼 IgG-Cy3를 세척한 후 그 발색 정도를 스캐너를 이용하여 살펴보았고, 그 결과는 도 3의 P번 스팟과 같았다. 마이크로어레이를 이용하여 줄을 집적한 후 Cy3 시그널이 선명하게 보이는 것을 확인할 수 있었으며, 정량적으로도 백그라운드에 비해서 수천 배 높은 것을 알 수 있었다.

<42> 단계 3: 집적된 단백질 스팟 내의 단백질 분포 상태 확인

<43> 칩의 표면에 고정시킨 단백질이 스팟 내에서 고르게 분포하는지를 확인할 목적으로, 상기 단계 2에서 집적한 칩에 대하여 스팟의 3차원적 구조를 확인하기 위해 공초점 레이저 주사 현미경을 이용하여 단백질의 분포를 살펴보았다. 그 결과는

도 5와 같았고, 고정된 스폿 내에서 단백질이 겔 표면이나 바닥에 부착되어 있지 않고 안쪽으로 고르게 분포하고 있음을 확인할 수 있었다.

<44> 실시예 4: 진단용 단백질 칩의 제작 및 항원-항체 반응

<45> 단계 1: HIV 진단 항원을 포함하는 단백질 칩의 제작

<46> 실시예 2에서 사용한 방법과 동일하게 폴리글리세릴실리케이트(PGS) 수용액, 테트라메틸오르토실리케이트(TMOS), 메틸트리메톡시실란(MTMOS)을 동비로 혼합하고 HCl(5 mM)을 첨가한 후 인산나트륨(100 mM, pH 7), 단백질 및 PBS 용액(15%)을 넣었다. 이것을 마이크로어레이어를 이용하여 플레이트 표면에 집적하였다.

<47> 이때 사용된 단백질은 정제된 HIV p24 단백질($1 \mu\text{g}/\mu\text{l}$), HIV 진단에 사용되는 p24를 포함하는 콤보(Combo) 단백질($1 \mu\text{g}/\mu\text{l}$), HIV 폴리머라제 RgpIII($1 \mu\text{g}/\mu\text{l}$)였다. 정량적인 실험을 위하여 각 단백질을 10배씩 연속 희석하여 집적하였다. 도 3에는 집적한 순서를 나타내었고, 도 4에서는 광학 현미경 상으로 보아 각 스폿들이 투명하고 바르게 집적되었음을 확인해주고 있다.

<48> 단계 2: 단백질 칩 표면 상의 항원-항체 반응 및 이의 검출

<49> HIV p24의 검출을 위하여 토끼 항-p24를 1차 항체로서 사용하여 항온처리 하였다. 4°C 에서 1 ~ 2시간 동안 항온처리를 실시하였다. 항온처리가 끝난 후 세척을 실시하고, Cy3-접합 항-토끼 IgG(시그마-알드리치 컴퍼니)를 2차 항체로서 사용하여 1차 항체 항온처리와 같은 조건으로 ~ 1시간 항온처리 한다. 마찬가지로 세척한 후 완전히 공기 건조시킨다. 스캐너(Vertex ChipReader)로 Cy3의 시그널을 확인한다. 도 3은 실시예를 나타낸 것이다.

<50> 도 3의 N번 스팟은 음성 대조군으로서, 단백질이 없어서 시그널이 나타나지 않는 것으로 항원-항체 반응이 일어나지 않았음을 확인할 수 있었다. P번 스팟은 양성 대조군으로서 이는 실시예 3에 설명되어 있다. 1번, 2번 스팟은 p24를 포함하고 있는 것이다. 1번은 p24 단백질과 이의 항체의 반응이 2차 항체에 의해 검출되어 시그널을 나타내고 있으나 2번의 경우에는 농도가 낮아서 약하게 검출된 것으로 보인다. 정량적으로도 2번의 시그널이 1번의 시그널보다 4배 이상 감소했음을 확인할 수 있다. 콤보 단백질을 포함하는 3번, 4번 스팟의 경우 콤보 단백질 자체가 p24를 포함하는 하이브리도마이기 때문에 시그널이 나타남을 확인할 수 있다. 이 경우에도 3번과 4번의 단백질 양의 차이로 인해 4번의 시그널이 감소한 것을 볼 수 있다. 5번, 6번 스팟은 HIV 폴리머라제인 RgpIII 단백질이므로 p24의 항체에 의해서 검출될 수 없는 단백질이다. 예상한 대로 5번, 6번의 스팟은 시그널이 거의 검출되지 않았으므로 항원-항체 반응이 일어나지 않은 것으로 보인다. 위의 결과를 종합해 볼 때, 줄-겔을 이용하여 본 발명에서 제작한 단백질 칩 상에서 항원-항체 반응이 특이적으로 일어난다는 것을 알 수 있다.

【발명의 효과】

<51> 본 발명의 방법은 새로운 단백질 칩의 개발을 통해 적은 양의 시료로 진단 등의 기존 기술을 수행하여 보다 빠르게 많은 양의 정보를 얻을 수 있게 하는 고효율 방법이다. 본 발명의 빠르고 쉬운 공정을 통하여, 단백질 칩에 DNA 칩과 같은 표면을 사용할 경우 발생하는 기존의 단백질 칩의 단백질 활성화도 문제를 해결할 수 있었다. 또한, 본 발명의 방법은 1개의 칩 안에서 적은 양의 시료로 빠른 시간 내에 여러 종류의 진단을 수행할 수 있어서 기존의 EIA 등의 진단법을 대체

할 수 있을 뿐 아니라, 감도가 수천에서 수만배 가량 향상된 고감도의 새로운 진단 방법이다.

<52> 본 발명 방법은 특히 현장(on-site)에서 실시되어야 하는 진단, 예를 들면 혈액 은행 스크리닝(blood bank screening) 등을 실시하는 데 있어서, 빠른 시간 내에 많은 질병을 한꺼번에 간단히 진단할 수 있게 하여 진단과 처방의 효율성을 더욱 높여줄 수 있는 방법이라고 할 수 있다.

<53> 또한, 본 발명의 단백질 칩은 경제적인 재료들과 용이한 공정 및 방법 등을 이용하여 적은 비용으로 제작이 가능하고, 대량 생산이 쉬워서 많은 시료의 진단을 더욱 용이하게 할 뿐만 아니라, 어느 단백질이든지 변형이나 태깅(tagging)없이 바로 고정화할 수 있기 때문에 각종 진단 마커에 편리하고 빠르게 응용할 수 있다. 본 발명을 토대로 하여 단백질 칩의 기본적인 기반을 마련할 수 있는 효과도 기대해 볼 수 있다.

<54> 상기에서 본 발명은 기재된 구체예를 중심으로 상세히 설명되었지만, 본 발명의 범주 및 기술사상 범위 내에서 다양한 변형 및 수정이 가능함은 당업자에게 있어서 명백한 것이며, 이러한 변형 및 수정이 첨부된 특허청구범위에 속하는 것도 당연한 것이다.

【특허청구범위】**【청구항 1】**

- (1) 졸-겔 캡슐화를 위한 중합 중간체를 제조하는 단계,
- (2) 칩의 표면을 코팅하는 단계,
- (3) 단계 (1)에서 제조된 중합 중간체와 표적 단백질을 포함하는 졸 형태의 혼합물을 제조하는 단계,
- (4) 단계 (3)에서 제조된 졸 형태의 혼합물을 상기 칩의 표면 상으로 집적하는 단계를 포함하는, 졸-겔 캡슐화 공정을 이용하여 표적 단백질을 단백질 칩의 표면에 고정화하는 방법으로서, 상기 중합 중간체는 실리케이트 단량체와 글리세롤의 반응으로 얻어지는 폴리글리세릴실리케이트(PGS)인 것인 방법.

【청구항 2】

제1항에 있어서, 상기 폴리글리세릴실리케이트(PGS)는 단량체로서 테트라메틸오르토실리케이트(TMOS), 테트라에틸오르토실리케이트(TEOS), 메틸트리메톡시실란(MTrMOS), 에틸트리에톡시실란(ETrEOS), 테트라메톡시실리케이트(TMS), 메틸트리메톡시실리케이트(MTMS), 3-아미노프로필트리메톡시실리케이트 중에서 선택되는 1종의 실리케이트 유도체와 글리세롤을 반응시켜 제조된 것이 특징인 방법.

【청구항 3】

제1항에 있어서, 단계 (2)에서 칩 표면의 코팅은 폴리비닐아세테이트(분자량 800), 폴리비닐아세테이트(분자량 1200), 폴리비닐아세테이트(분자량 3000), 폴리비닐아세테이트(분자량 5000), 폴리비닐아세테이트(분자량 12000), 폴리비닐

아세테이트(분자량 22000), 폴리비닐아세테이트(분자량 50000), 폴리비닐아세테이트(분자량 100000) 중에서 선택되는 1종의 물질을 염화메틸렌(MC), 테트라히드로푸란(THF) 중에서 선택되는 용매에 용해시킨 용액으로 스핀 코팅에 의해 수행되는 것이 특징인 방법.

【청구항 4】

제1항에 있어서, 상기 졸 형태의 혼합물은 pH 완충용액을 더 포함하는 것이 특징인 방법.

【청구항 5】

제4항에 있어서, 상기 pH 완충용액은 인산염 완충액인 것이 특징인 방법.

【청구항 6】

제5항에 있어서, 상기 pH 완충용액의 pH는 5, 5.5, 6, 6.5, 7, 7.5, 8, 8.5 중에서 선택되는 것이 특징인 방법.

【청구항 7】

제1항의 방법에 의해 제작되고, 스폿의 직경이 약 10 ~ 500 μm 가 되도록 하여 1 cm^2 당 10개 이상 10,000개 이내의 스폿을 집적시킨 단백질 칩.

【청구항 8】

제7항의 단백질 칩을 이용한 감염성 질환 혹은 암의 진단 방법.

【청구항 9】

제7항의 단백질 칩을 이용한 고효율 스크리닝(HTS).

1020020055635

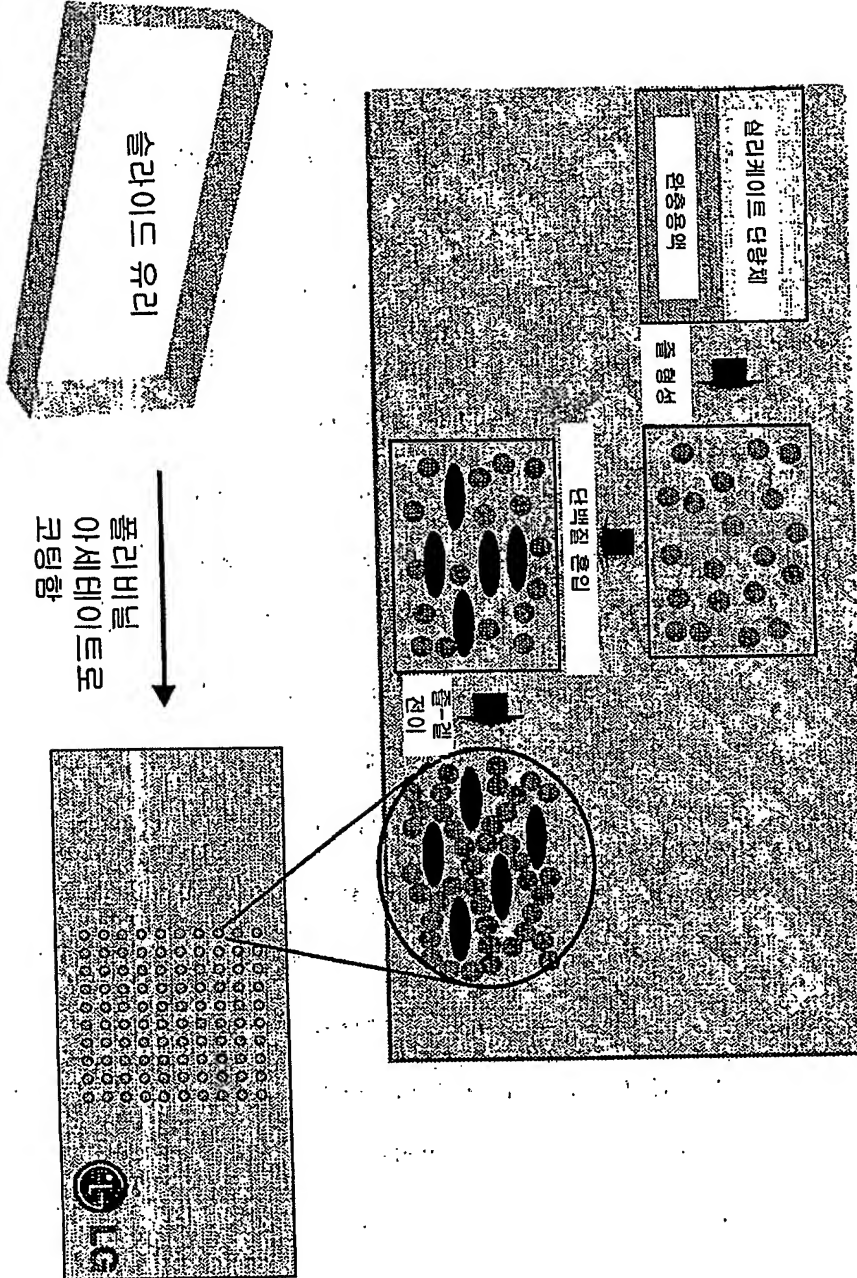
출력 일자: 2003/8/28

【청구항 10】

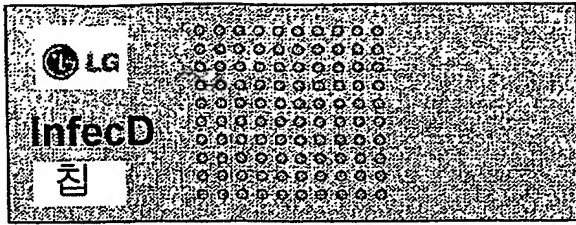
제7항의 단백질 칩을 이용한 효소활성측정 방법.

【도면】

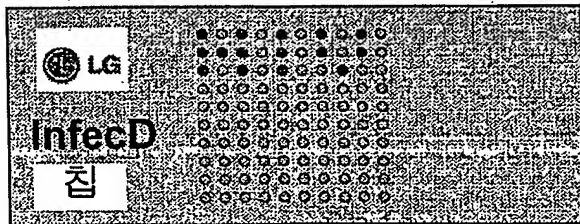
【도 1】



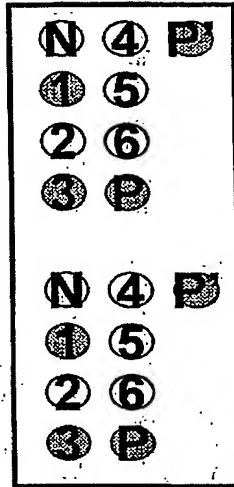
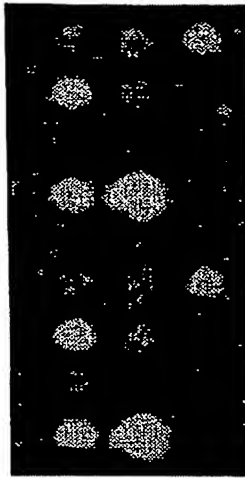
【도 2】



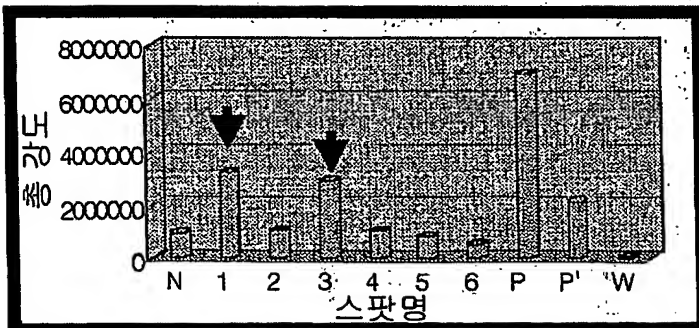
- 1단계 ↓ 환자 혈청과 항은 처리
하고 세척함
- 2단계 ↓ 표지된 사람 2차 항체와
항은 처리하고 세척함
- 3단계 ↓ 스캐닝 및 분석



【도 3】

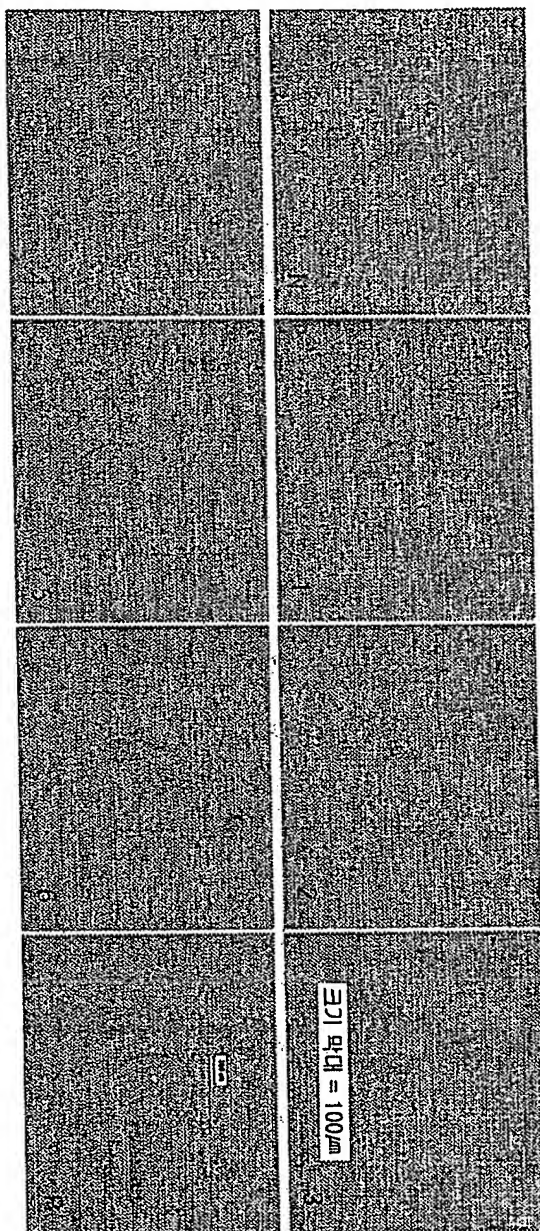


N : 단백질 없음
 1 : HIV P24 단백질 10ng/10nl
 2 : HIV P24 단백질 1ng/10nl
 3 : 콤보 단백질 (P24+) 10ng/10nl
 4 : 콤보 단백질 (P24+) 1ng/10nl
 5 : RgpIII 단백질 10ng/10nl
 6 : RgpIII 단백질 1ng/10nl
 P : Cy3 표지된 2차 항체
 P' : p24 항체



【도 4】

N : 단백질 없음
1 : HIV P24 단백질 10ng/10nl
2 : HIV P24 단백질 1ng/10nl
3 : 콤보 단백질 (P24+) 10ng/10nl
4 : 콤보 단백질 (P24+) 1ng/10nl
5 : RgpIII 단백질 10ng/10nl
6 : RgpIII 단백질 1ng/10nl
P : Cy3 표지된 2차 항체



【도 5】

